

急性白血病患者骨髓内皮祖细胞的变化与微血管密度的关系

耿丛丛¹⁾, 申政磊²⁾, 何文娴¹⁾, 夏梅花¹⁾, 尹列芬¹⁾, 佟力³⁾, 杨玲¹⁾

(1) 昆明医科大学第二附属医院血液科, 云南昆明 650101; 2) 云南省肿瘤医院血液科, 云南昆明 650118; 3) 昆明医科大学第一附属医院, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨急性白血病患者骨髓内皮祖细胞(EPCs)数量变化与骨髓微血管密度的关系。**方法** 采用流式细胞术检测36例初诊急性白血病患者骨髓EPCs数量,同时应用免疫组织化学法(SP法)检测骨髓活检样本微血管密度(MVD),以良性血液病患者10例为对照组。**结果** AL患者骨髓EPCs绝对计数(108.36 ± 15.43)个/ μL 较对照组(16.10 ± 5.26)个/ μL 显著升高($P < 0.01$)。AL患者骨髓MVD为(19.31 ± 2.29)/400倍视野较对照组(7.70 ± 1.64)/400倍视野,显著升高($P < 0.01$)。经Pearson相关性分析,AL患者骨髓EPCs绝对计数与骨髓MVD呈正线性相关 $r = 0.963$, $P < 0.01$ 。**结论** 内皮祖细胞在AL骨髓血管新生中可能具有一定作用,有可能成为AL抗血管生成治疗的新靶点。

[关键词] 急性白血病; 内皮祖细胞; 微血管密度

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 04 - 0059 - 04

Changes of Endothelial Progenitor Cells in Bone Marrow of Acute Leukemia Patients and Its Association with Microvessel Density

GENG Cong - cong¹⁾, SHEN Zheng - lei²⁾, HE Wen - xian¹⁾, XIA Mei - hua¹⁾, YIN Lie - fen¹⁾, TONG Li³⁾, YANG Ling¹⁾

(1) Dept. of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Hematology, The Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650118; 3) The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China.)

[Abstract] **Objective** To evaluate the count of endothelial progenitor cells (EPCs) in bone marrow of acute leukemia (AL) patients and its association with microvessel density. **Methods** EPCs were quantified by flow cytometry procedures in 36 AL patients at the time of diagnosis. Microvessel density (MVD) in bone marrow was determined by immunohistochemistry method with 10 benign hemopathy patients as control group. **Results** Absolute count of EPCs in bone marrow of AL patients ($108.36 \pm 15.43/\mu\text{L}$) was significantly higher than control group ($16.10 \pm 5.26/\mu\text{L}$) ($P < 0.01$). Compared with the control group ($7.70 \pm 1.64/400$ magnification), MVD in bone marrow of acute leukemia patient ($19.31 \pm 2.29/400$ magnification) was significantly higher ($P < 0.01$). Absolute count of EPCs in bone marrow of AL patients was positively correlated with MVD value ($r = 0.963$, $P < 0.01$) by Pearson correlation analysis. **Conclusion** EPCs may play an important role in the microvessel hyperplasia in AL, and could be a new target for the treatment of AL.

[Key words] Acute leukemia; Endothelial progenitor cells; Microvessel density

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81241122); 云南省科技厅应用基础研究重点资助项目(2008CD121)

[作者简介] 耿丛丛(1986~)女,山东德州市人,在读硕士研究生,主要从事血液肿瘤临床工作。

[通讯作者] 尹列芬. E-mail: ylfynkm@126.com

急性白血病 (acute leukemia, AL) 是造血系统恶性克隆性疾病, 严重威胁人类健康和生命, 目前治疗主要以联合化疗为主, 完全缓解 (complete remission, CR) 率 60% ~ 85%, 长期生存率约 30% ~ 60%。随着血管新生在实体肿瘤中的作用已得到广泛认可, 抗血管生成治疗已成为当前肿瘤治疗的热点。血管新生在血液系统恶性肿瘤中的研究以多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 最早^[1], 目前沙利度胺用于治疗 MM, 其抗血管新生作用已被证实。近年研究^[2-4]发现急性白血病 AL 患者骨髓血管新生明显增多, 提示血管新生在其发病机制中扮演重要角色, 是否白血病与多发性骨髓一样, 可以通过抗血管生成机制进行治疗有待证实, 内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 是内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 的前体细胞, 参与实体肿瘤的血管生成^[5], 但其在 AL 骨髓血管新生的作用未见报道。本研究通过检测 AL 患者骨髓 EPCs 数量和骨髓微血管密度 (microvessel density, MVD), 初步探讨 EPCs 与 AL 骨髓血管新生的关系, 为寻求白血病抗血管生成治疗新靶点提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验样本

选取 2009 年 1 月至 2011 年 7 月昆明医科大学第一附属医院血液科初诊 AL 患者 36 例为研究对象, 其中男 19 例, 女 17 例, 中位年龄 36 岁 (19 ~ 68 岁), ALL 患者 15 例, AML 患者 21 例, 诊断符合《血液病诊断及疗效标准》^[6]。良性血液病对照 10 例, 其中特发性血小板减少性紫癜 2 例、巨幼细胞性贫血 3 例、缺铁性贫血 5 例 (病因为月经过多 2 例、消化道溃疡 3 例), 中位年龄 32 岁 (15 ~ 69 岁)。

1.2 实验方法

1.2.1 样本采集 取患者骨髓 2 mL 存于 EDTA 管, 送流式细胞仪检测, 同时取患者骨髓 1 mL 存于 EDTA 管行骨髓有核细胞计数检测。取髂前或髂后上棘骨组织约 1 ~ 2 cm 置于 Bouin 固定液送检。

1.2.2 主要试剂及仪器 细胞表面标志: KDR⁺ CD133⁺ CD45⁺ CD34⁺ (CD34-2FITC 及同型对照、CD45-2Cy5 购自美国 Beckman Coulter 公司、CD133-2RPE 及同型对照均购自美国 eBioscience 公司)。兔抗人 vWF 多克隆抗体 (福建迈新生物技术有限公司)、抗兔 IgG-HRP 多聚体 (福建迈新生物技术有限公司)、DAB 显色液 (Dako 公司)。主

要仪器为 Beckman Coulter Cytomics FC 500 MPL 流式细胞仪、日本 Sysmex XE-2100 全自动五分类血细胞分析仪。

1.2.3 检测方法 (1) 流式细胞术: 样本用 PBS 对倍稀释, Ficoll 分离, 1 500 r/min 离心 20 min, PBS 洗涤 2 次。将细胞加入 96 孔板中, 每孔 5×10^5 , 加入抗体 5 μ L, 4℃ 孵育 30 ~ 60 min, 用 PBS 洗涤样本 2 次, 100 μ L 的 1% 多聚甲醛固定, 流式细胞仪检测得出 EPCs 相对计数, 血液分析仪检测得出有核细胞总计数, 根据绝对计数计算公式^[7] (目标细胞绝对计数 = 有核细胞总计数 $\times$ 目标细胞百分比) 计算出 EPCs 的绝对计数; (2) 免疫组化 (SP 法) 检测: 骨髓活检样本常规制备石蜡包埋切片 4 μ m 厚。使用兔抗人 vWF 多克隆抗体标记内皮细胞。二抗采用抗兔 IgG-HRP 多聚体, 常规显色、苏木素复染、脱水、透明、封片。

MVD 计算: 凡呈现棕色单个内皮细胞或内皮细胞簇作为一个血管计, 除外肌层较厚的血管。计数方法, 首先用低倍镜 (10 $\times$ 10) 扫视整张切片, 确定微血管最密集的 3 个视野 (热点), 然后在高倍镜 (10 $\times$ 40) 视野范围内计数所有染色的微血管。取 3 个视野计数结果的均数为该切片的微血管数^[8]。

1.3 统计学分析

经 K-S 检验 EPCs 绝对计数服从正态分布, 数据资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; AL 患者组与对照组数据比较采用两样本均数的 *t* 检验; 骨髓 EPCs 绝对计数和 MVD 计数呈线性相关, 经 pearson 相关分析两者关系, 以上分析采用 SPSS 统计软件完成。

2 结果

AL 患者骨髓 EPCs 绝对计数较对照组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); AL 患者骨髓 MVD 较对照组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。免疫组化结果 (见图 1) 显示 AL 患者骨髓微血管较正常对照组数量多, 血管腔呈显著不规则分支状, 细小分支多见, 形态较幼稚; 小血管无血管腔 (图 1A、1C)。对照组骨髓微血管血管管腔较规则, 分支少, 形态较成熟 (图 1B、1D)。

EPCs 绝对计数与骨髓 MVD 经 Pearson 相关性分析, AL 患者骨髓 EPCs 绝对计数与骨髓 MVD 呈正线性相关 ($r = 0.963$, $P < 0.01$), 见图 2。

表 1 对照组及 AL 患者骨髓 EPCs 绝对计数及 MVD 检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The results of bone marrow EPCs counts and MVD in AL patients and control ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	EPCs (个/μL)	MVD (/400 倍视野)
AL 组	36	108.36 ± 15.43**	19.31 ± 2.29**
对照组	10	16.10 ± 5.26	7.70 ± 1.64

与对照组比较, ** $P < 0.01$.

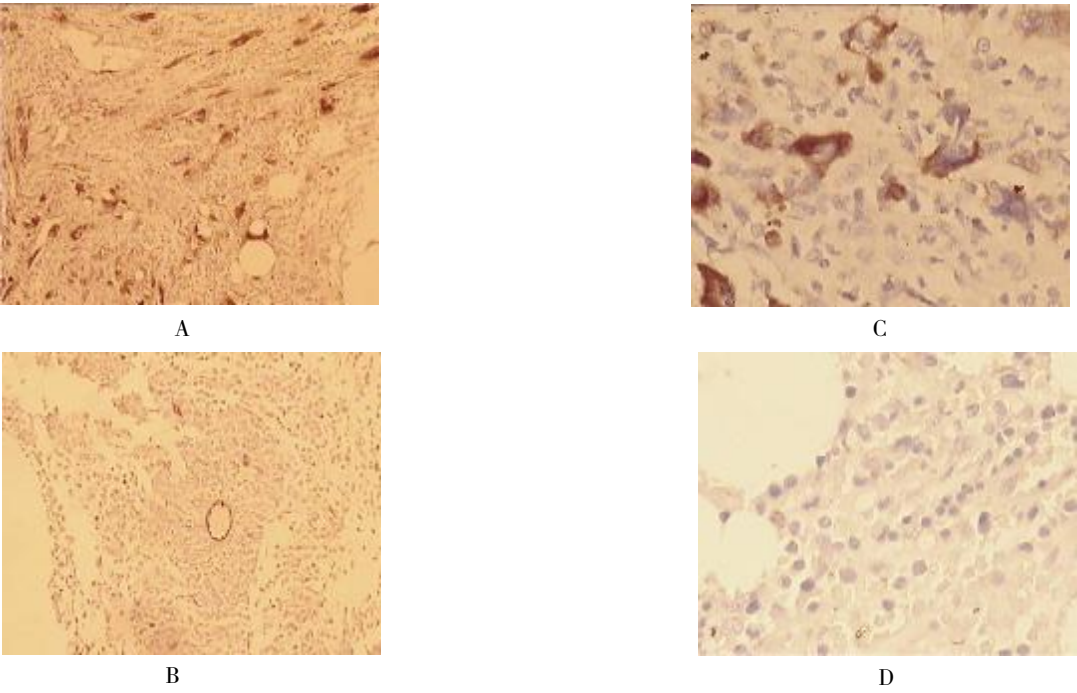


图 1 AL 患者骨髓 MVD 与对照组 MVD 比较

Fig. 1 Comparison of bone marrow MVD between AL patients and control

A:AL 患者 MVD (×100); B:正常对照 MVD (×100); C:AL 患者 MVD (×400); D:正常对照 MVD (×400)

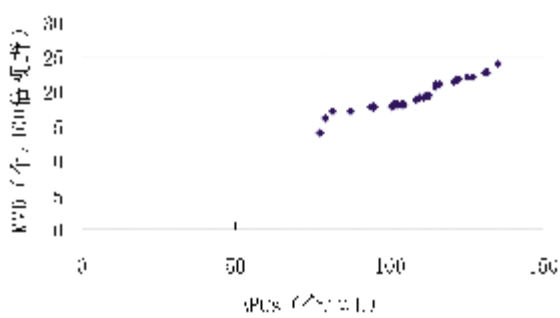


图 2 AL 患者骨髓 EPCs 计数与 MVD 计数散点图

Fig. 2 The scatterplot of bone marrow EPCs counts and MVD in AL patients

3 讨论

1997 年, Asahara 等^[9]首次分离并证实成年人外周血中存在着能分化为血管内皮细胞的 EPCs, 是造血微环境的重要细胞成分, 研究证实^[5]EPCs 的

迁移、分化、增殖参与实体肿瘤的血管新生. I-greja C 等^[10]研究发现非霍奇金淋巴瘤患者的血液循环和肿瘤实体中 EPCs 水平较正常人升高. Wierzbowska A 等^[11]检测发现 AML 患者外周血 EPCs 绝对计数较对照组升高, 其数量变化与病情进展及疗效密切相关. 本研究显示 AL 患者骨髓中 EPCs 绝对计数较对照组显著升高, AL 患者骨髓中 EPCs 存在数量上的变化, 提示 EPCs 可能与 AL 发病有关.

肿瘤血管生成在肿瘤生长和转移中发挥重要作用, MVD 检测是评价肿瘤内血管生成的量化指标. 国内外学者^[2-4]研究证实在白血病患者骨髓存在血管新生, Todorovic M^[2]等研究发现 ALL 患者骨髓 MVD 显著升高, 认为血管新生在 ALL 病理生理机制中扮演了重要角色. Jufang Fu^[3]等研究发现 AML 患者骨髓 MVD 升高, 并与骨髓 CD147、血管内皮生长因子 (VEGF) 表达水平呈正相关. 刘学

文^[4]等研究发现白血病患者骨髓 MVD、VEGF、骨髓细胞环氧化酶-2 (COX-2) 阳性率均较对照组升高, 认为白血病可能同实体瘤一样具有血管新生依赖性。本研究显示 AL 患者骨髓 MVD 较正常对照组显著升高, 提示血管新生在 AL 发病机制中扮演重要角色, 与上述报道一致。

EPCs 已被证实能分化为血管内皮细胞, EPCs 的迁移、分化、增殖参与肿瘤的血管新生, 本研究分析 EPCs 计数与 MVD 的关系提示 AL 患者骨髓 EPCs 绝对计数与 MVD 呈正相关, 推测 EPCs 在 AL 患者骨髓血管新生中起重要作用, EPCs 有可能成为白血病抗血管生成治疗的新靶点, 有望通过抑制 EPCs 的分化、增殖达到抗白血病血管生成的目的, 为急性白血病的治疗寻找新途径。

[参考文献]

- [1] VACCA A, RIBATI D, RONCALI, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma[J]. *Br J Haematol*, 1994, 87(3):503 – 508.
- [2] TODOROVIC M, RADISAVLJEVIC Z, BALINT B, et al. Increased angiogenesis-associated poor outcome in acute lymphoblastic leukemia: a single center study [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2012, 20(5):488 – 493
- [3] FU J, CHEN X. CD147 and VEGF coexpression predicts prognosis in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40(11):1 046 – 1 052.
- [4] 刘学文, 贺其图, 李志琴, 等. 环氧化酶-2在白血病患者骨髓细胞中表达及与血管新生的关系[J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 01:40 – 42.
- [5] GOON P K, LIP G Y, BOOS C J, et al. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(2):79 – 88.
- [6] 张之南, 沈悌. 血液病治疗及疗效标准[M]. 北京: 科学技术出版社, 1998:168 – 178.
- [7] RIGOLIN G M, MAURO E, CICCONE M, et al. Neoplastic circulating endothelial-like cells in patients with acute myeloid leukaemia [J]. *Eur J Haematol*, 2007, 78(5): 365 – 373.
- [8] PADRO T, RUIZ S, BIEKER R, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2000, 95(8):2 637.
- [9] ASAHARA T, MUROHARA T, SULIVAN A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5 302):964 – 967.
- [10] IGREJA C, COURINHA M, CACHACO A S, et al. Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients[J]. *Haematologica*, 2007, 92(4):469 – 477.
- [11] WIERZBOWSKA A, ROBAK T, KRAWCZYNSKA A, et al. Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Eur J Haematol*, 2005, 75:492 – 497.

(2013 – 02 – 14 收稿)